

КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЬ ПРОТИВО- АНЕМИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РОНДФЕРРИН: ТЕХНОЛОГИЯ ПРО- ИЗВОДСТВА, ФИЗИКО- ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, СТА- БИЛЬНОСТЬ ПРЕПАРАТА

Научно-фармацевтический центр
ОАО Белмедпрепараты, г. Минск

В работе изложены основные технологические стадии производства кровезаменителя противоанемического действия рондферрин, который получен на основе металлодекстрановых комплексов (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Si^{2+} , Co^{2+}). Разработаны оригинальные методы контроля качества препарата, изучены физико-химические свойства. Анализ стабильности рондферрина, выполненный на промышленных сериях производства ОАО «Белмедпрепараты» свидетельствует о соответствии нормируемых показателей качества требованиям ФС РБ 4200-2000 в течение не менее 2 лет. Разработанный состав и особенности физико-химических свойств рондферрина обусловили полифункциональность его свойств – гемодинамических, реологических, противоанемических.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальной проблемой современной фармации является разработка новых кровезаменителей с заданными терапевтическими свойствами. Невысокая клиническая эффективность применяющихся в инфузионно-трансфузионной терапии кровезаменителей на основе декстрана, разработанных в ЦОЛИПК и внедренных в производство на ПО Белмедпрепараты в начале 60-х годов (полиглюкин, реополиглюкин, гемодез и др.) и наличие в них ряда отрицательных показателей (высокая анафилактикогенность, реактогенность и др.) обуславливают необходимость разработки новых препаратов, позволяющих быстро и эффективно проводить коррекцию и ста-

билизацию гемодинамических показателей. Известно [1], что значительное число неблагоприятных исходов и осложнений при ряде болезней и неотложных состояний связаны с развитием нарушений системной гемодинамики и микроциркуляции. При массивных кровопотерях развивается ДВС синдром, железодефицитная анемия (ЖДА), нарушаются показатели гемодинамики, реологии. Поэтому разработка препарата, способного купировать такого рода патологические состояния, требует принципиально нового подхода. Ранее разработанный кровезаменитель полифер (ВФС 42-977-80 "Полифер") был снят с производства и применения в клинической практике в силу целого ряда неблагоприятных побочных действий [2] и плохой воспроизводимости технологического процесса.

Целью данного исследования являлась разработка нового технологического процесса получения кровезаменителя на основе металлодекстранового комплекса с использованием радиационно-модифицированного декстрана [9] и биологически активных микроэлементов, изучение физико-химических свойств и его стабильности.

Разработка кровезаменителя противоанемического действия рондферрин выполнена в рамках Республиканской Государственной научно-технической программы «Здоровье» по теме «Разработать кровезаменитель полифункционального действия «Рондферрин» на основе железодекстранового комплекса по радиационно-химической технологии» (шифр темы 69.03р42.02).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили: нативный декстран с молекулярной массой 25000 кДа (производство ОАО Белмедпрепараты), низкомолекулярный радиационно-модифицированный декстран [9], металлодекстрановый комплекс [11] и препарат рондферрин промышленных серий производства ОАО "Белмедпрепараты".

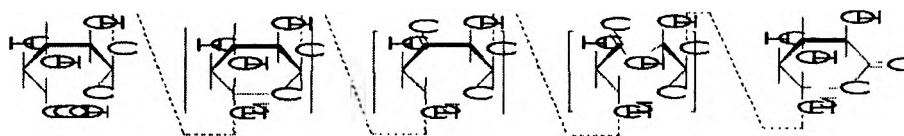
Исследования характера и степени модификации декстрана проводили спек-

тральными методами на спектрофотометре СФ-46, ИК-спектрометре UR-75. Комплексы изучали методом фотоэлектронной спектроскопии. Размеры кластеров железа в рондферрине определены методом просвечивающей электронной микроскопии при увеличении 60000-120000 на аналитическом электронном микроскопе ЭММА-4.

Концентрацию водных растворов декстранов определяли поляризметрически на поляриметре "Polamat" (Германия), используя удельный угол вращения $[\alpha]_D = 199,4^\circ$ для нативного и кислотно-гидролизованного декстрана ("Полиглюкин") [3], а для радиационно-модифицированного декстрана - $[\alpha]_D = 191,6^\circ$. Удельный угол вращения плоскости поляризации для радиационно-модифицированного декстрана существенно отличается от $[\alpha]_D$ для кислотно-гидролизованного декстрана в связи с тем, что при радиоллизе происходит химическая модификация декстрана, приводящая к изменению оптической активности [5].

Относительные и характеристические вязкости растворов определяли, используя капиллярные вискозиметры [4].

Исследования качества проб для укупорки рондферрина проводили путем анализа продуктов газовой выделения методом масс-спектрометрии на приборе МК-1320



в диапазоне температур 20-220°C. Объектом исследования были образцы проб ИР-21, 25П по ТУ 38-006269-90, 52369/1 по ТУ 380006269-95 и 52599/3 по ТУ 58.106618-95.

Для получения рондферрина использовали: железо треххлористое 6-водное (ГОСТ 4147-74), кобальт хлористый 6-водный (ГОСТ 4525-77); медь двуххлористую 2-водную (ГОСТ 4167-74), натрия хлорид (ФС 42-2572-95), воду для инъекций (ФС 42-2620-97).

Контроль качества рондферрина проводили по ВФС 42Б-42-97 и ФС РБ 0042-2000. Качество реактивов, исполь-

зуемых при анализе рондферрина, соответствует требованиям ГФ XI [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе был предложен и фармакологически обоснован состав препарата рондферрин, способный обеспечить полифункциональность действия разрабатываемого кровезаменителя [7]. В качестве полимерной основы в препарате использован радиационно-модифицированный декстран с молекулярной массой 60000 Да, что характерно для декстрановых препаратов гемодинамического действия.

Относительная вязкость полимера - 2,8, характеристическая вязкость - 0,169 дл/г; такие гидродинамические характеристики присущи кровезаменителям реологического ряда. Кроме того, радиационно-модифицированный декстран выбран как комплексообразователь, поскольку его ангидроглюкозные звенья в результате модификации включают дополнительные функциональные группы (карбонильные, карбоксильные, альдегидные), обеспечивающие высокую комплексообразующую способность [15].

В качестве факторов, стимулирующих гемо(эритро)поэз, в состав кровезаменителя введены железо, медь, кобальт. Их количественное содержание в рондферри-

не соответствует физиологическим нормам этих микроэлементов в организме.

Созданный кровезаменитель рондферрин представляет собой стерильный апиrogenный водный раствор металлодекстрановых комплексов на основе радиационно-модифицированного декстрана и указанных микроэлементов. В 1 л препарата содержится 60 г декстрана, 0,175 г железа комплексно связанного; 1,25 мг меди комплексно связанной; 15 мкг кобальта комплексно связанного. Комплексно связанное железо в рондферрине содержится в двух валентных состояниях: 75 % - Fe^{+++} , 25 % - Fe^{++} . Кластерные частицы железа в рондферрине практически монодисперсны, их

размеры находятся в интервале значений 50-120 Å и сопоставимы со средними гидродинамическими размерами молекул модифицированного декстрана в рондферрине (гидродинамические радиусы которых $R \approx 70$ Å), в то время как размеры коллоидных частиц железа в полифере достигают 650 Å [13]. Для обеспечения гемопозитического действия железа оптимальным является присутствие этого микроэлемента в виде железосодержащего ядра β -FeOOH, окруженного стабилизирующими молекулами (как, например в трансферрине и ферритине), что и реализовано в рондферрине.

Основные закономерности радиационно-химических процессов и комплексобразования, установленные в работе [11] были положены в основу технологии получения рондферрина. Ниже представлена схема производства рондферрина, включающая основные технологические стадии:

- Микробиологический синтез нативного декстрана осуществляется с использованием *Leuconostoc mesenteroides*, штамм БМП 98 [13], селекция которого выполнена в рамках этой работы. Основным компонентом питательной среды является сахароза, при синтезе декстрана микроорганизм расщепляет дисахарид на глюкозу и фруктозу; в процесс микробиологического синтеза декстрана включается только глюкоза. Продолжительность синтеза составляет около 48 часов. Процесс не требует аэрации. Выход нативного декстрана составляет около 30 % от содержания сахарозы в питательной среде. Нативный декстран имеет молекулярную массу $(25-27) \cdot 10^6$ Да, широкое молекулярно-массовое распределение (ММР), его полидисперсность $\bar{M}_w / \bar{M}_n > 20$, где \bar{M}_w - среднемассовая молекулярная масса, \bar{M}_n - среднечисленная молекулярная масса, а характеристическая вязкость 6% водного раствора нативного декстрана составляет 1,2-1,4 дл/г.
- Очистка нативного декстрана осуществляется путем переосаждения его органическим растворителем, например, этило-

вым спиртом, в соотношении: водный раствор 2% нативного декстрана - этиловый спирт как 1:0,7. Степень очистки нативного декстрана от моно- и дисахаров контролируется путем определения среднечисленной молекулярной массы \bar{M}_n методом концевых групп. Проводится контроль на содержание фосфатов и других солевых компонентов.

- Вакуумную отгонку спирта из нативного декстрана осуществляют до значений, не превышающих 0,1 %. Это имеет принципиальный характер для радиационной деструкции, так как этиловый спирт является ингибитором радиационной деструкции и модификации полисахарида. Содержание остаточного спирта контролируется методом газо-жидкостной хроматографии.
- Процесс подготовки раствора нативного декстрана к радиолизу заключается в следующем: в водный раствор нативного декстрана с содержанием декстрана 6,5 г/дл вводят 2N раствор NaOH до достижения pH 10,5-11,5, а также H_2O_2 , выполняющую роль инициатора радиационных процессов, до ее концентрации 0,10-0,12 %. Температура раствора должна иметь значение 20 ± 2 °C. При более высоких значениях температуры происходит разложение перекиси водорода в щелочном растворе декстрана.
- Радиолиз нативного декстрана осуществляется в проточном аппарате змеевикового типа РХВ-01-Т объемом 450 л. Интегральная доза, необходимая для деструкции нативного декстрана до молекулярной массы 65-70 кДа, составляет 8,5-9,5 кГр. Равномерность дозы обеспечивается подачей раствора нативного декстрана в РХВ насосами-дозаторами НЕМО фирмы Netzsch (Германия). Скорость прохождения раствора в зоне γ -облучения контролируется и регистрируется с помощью многофункциональной регистрационной системы 1010N/DN фирмы Controlotron (США).
- Радиационно-модифицированный декстран направляют в аппарат, в котором осуществляют дополнительную очистку и депирогенизацию раствора путем тер-

ческой обработки при 105 °С в присутствии активированного угля (2 г/л) в течение 15-20 мин. После этого проводят ветляющую фильтрацию, и раствор радиационно-модифицированного декстрана с молекулярной массой 60000 Да концентрацией $6,0 \pm 0,5$ г/дл направляют на процесс комплексования с микр-элементами.

Для получения 1000 л водного раствора металлодекстранового комплекса в аппарат с мешалкой вместимостью 1,5 м³ вводят 980 л 6,2% раствора радиационно-модифицированного декстрана с предыдущей стадии, вводят 15 л заранее подготовленного водного раствора $FeCl_3$ концентрацией по железу 10 г/л, перемешивают, добавляют 1 л водного раствора $CuCl_2$ с концентрацией по меди 1 г/л, перемешивают, добавляют 2,4 л водного раствора $CoCl_2$ с концентрацией по кобальту 0,01 г/л. Все вводимые растворы подвергают предварительной фильтрации. Раствор нагревают при перемешивании до 60 °С, доводят pH раствора, прибавляя раствор 2N $NaOH$ в течение двух часов до значения 9,0. Для стабилизации металлодекстрановых комплексов раствор нагревают в аппарате под давлением при перемешивании до температуры 102,5-105,0 °С в течение 40 мин. После этого раствор охлаждают до комнатной температуры и направляют на стадию дополнительной очистки, которую осуществляют аналогично очистке радиационно-модифицированного декстрана.

После проведения осветляющей фильтрации в раствор металлодекстранового комплекса вводят хлорид натрия до концентрации 0,9 г/дл. Цеховая лаборатория осуществляет контроль физико-химических показателей рондферрина на соответствие требованиям ФС, при необходимости осуществляют коррекцию pH, концентрации $NaCl$, декстрана и др. показателей. Рондферрин направляют на стерилизующую фильтрацию с использованием ультрафильтрационных систем (размеры пор 0,22 мкм).

Следующей технологической стадией является розлив препарата в бутылки для

кровезаменителей и их укупорка. Укупоренные флаконы с препаратом передают на стадию термической стерилизации, которая осуществляется в автоклаве при 120 °С в течение 15 мин.

- После автоклавирования препарат направляется на этикетировку и упаковку.

Технологический процесс получения рондферрина, представленный в работе, был изложен в Опытном-промышленном регламенте ОПР № 170 от 29.12.1994, на основе которого разработан действующий Промышленный регламент ПР. 76-97 ОАО "Белмедпрепараты". Осуществляется авторский надзор за производством данного кровезаменителя.

Для анализа препарата рондферрин используют методы, приведенные в ВФС 42Б-42-97, в настоящее время контроль проводится по ФС РБ 0042-2000.

При разработке нормативной документации за основу приняты методы анализов, рекомендуемые ГФ XI [4]. Разработан ряд оригинальных методов, позволяющих контролировать качественные и количественные показатели рондферрина.

Препарат Рондферрин имеет красновато-коричневый оттенок, что объясняется спектральными характеристиками водного раствора желездекстранового комплекса.

Для оценки подлинности препарата используют несколько реакций:

- 5 мл препарата смешивают в пробирке с 4 каплями раствора кислоты хлористоводородной концентрированной и выпаривают на слабом огне до получения 0,1-0,2 мл, прибавляют 3 мл реактива Фелинга и кипятят в течение 20 с, образуется красный или красно-коричневый осадок (декстран модифицированный).
- Препарат дает характерную реакцию на натрий [4].
- Препарат дает характерную реакцию на хлориды [4].
- Препарат дает характерные реакции на железо окисное [4].
- К 10 мл препарата прибавляют 0,5 мл раствора кислоты хлористоводородной концентрированной, нагревают до кипения и продолжают нагревание в течение 1-2 мин. В пробирку отбирают 1 мл охлажденного раствора препарата, в дру-

гую – 1 мл воды. В каждую пробирку прибавляют по 1 мл раствора железа роданистого и по 3 мл 0,1 М раствора натрия серноватистокислового и перемешивают. Раствор в пробирке с препаратом обесцвечивается немедленно, в то время как раствор в пробирке с водой обесцвечивается в течение 1,5-2 мин (медь).

Необходимость в разработке методов контроля микроэлементов в препарате рондферрин обусловлена отсутствием стандартных методик, обеспечивающих необходимую чувствительность.

Железо в препарате должно содержаться в виде комплексов, стабилизированных молекулами декстрана. Недопустимо присутствие в препарате свободных ионов железа, так как они могут приводить к активизации реакции перекисного окисления липидов в организме больного. Ниже приводятся методы контроля железа комплексно связанного, ионов свободного железа, а также комплексно связанных меди и кобальта.

Определение железа комплексно связанного. Железо в рондферрине находится в комплексно связанном состоянии в виде $\beta\text{-FeOOH}$ [13]. Разработанная методика контроля содержания железа обеспечивает большую надежность и точность определения. Определение содержания железа в рондферрине проводят следующим образом: разрушают железодекстрановый комплекс нагреванием препарата в присутствии концентрированной хлористоводородной кислоты, охлаждают раствор, доводят рН водным аммиаком до 1,3. Повторно нагревают до 60-70° С, прибавляют около 100 мг аммония надсернокислового и 1 мл 10% раствора сульфосалициловой кислоты, титруют 0,01 М раствором трилона Б при перемешивании.

Параллельно проводят контрольный опыт.

Содержание железа в 1 мл препарата (X_{Fe}), в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(V_1 - V_2) \cdot K \cdot 0,000558}{50},$$

где: V_1 - объем 0,01 М раствора трилона Б, израсходованный на тит-

рование испытуемого раствора, в миллилитрах;

V_2 - объем 0,01 М раствора трилона Б, израсходованный на титрование контрольного опыта, в миллилитрах;

K - поправочный коэффициент к молярности 0,01 М раствора трилона Б;

0,000558 - количество железа, соответствующее 1 мл 0,01 М раствора трилона Б, в граммах;

50 - объем пробы препарата, взятый на анализ, в миллилитрах.

Содержание железа комплексно связанного в 1 мл препарата должно быть от 0,00015 до 0,00020 г.

Медь комплексно связанная. Метод определения меди комплексно связанной основан на образовании комплекса меди с натрием N,N-диэтилдитиокарбаматом и экстракцией этого комплекса в хлороформ. Препарат нагревают в присутствии кислоты азотной концентрированной до получения прозрачного раствора желтого цвета, охлаждают, прибавляют 20% раствор натрия лимоннокислого, 4% раствора трилона Б и раствором аммиака доводят рН до 6,5-9,0. В раствор прибавляют 5,0 мл 0,1% раствора натрия N,N-диэтилдитиокарбамата, перемешивают и оставляют на 15 минут. Переносят раствор в делительную воронку вместимостью 150 мл, прибавляют 5 мл хлороформа, 3 г аммония сернокислового и встряхивают в течение 2 мин. Отделяют нижний хлороформный слой и фильтруют его в мерную колбу вместимостью 25 мл через бумажный фильтр, на который предварительно помещают 3 г натрия сернокислового безводного. Параллельно проводят определение меди в растворе рабочего стандартного образца (РСО) меди и контрольный опыт с 20 мл воды.

Содержание меди в 1 мл препарата X_{Cu} , в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 63,54}{D_0 \cdot 10^5 \cdot 170,49}$$

где: D_1 - оптическая плотность хлороформного извлечения из испытуемого раствора;
 D_0 - оптическая плотность хлороформного извлечения из раствора РСО меди;
 m_0 - масса навески РСО меди, в граммах;
 10^5 - коэффициент пересчета содержания меди в 1 мл препарата;
 63,54 - атомная масса меди;
 170,49 - молекулярная масса меди двухлористой 2-водной.

Содержание меди комплексносвязанной в 1 мл препарата должно быть от $1,0 \cdot 10^{-6}$ до $1,5 \cdot 10^{-6}$ г.

Кобальт комплексносвязанный. Известные методы определения содержания кобальта в растворе в присутствии железа и меди не обеспечивают достаточной чувствительности, необходимой для контроля кобальта непосредственно в препарате. Разработанный метод предполагает извлечение кобальта из 500 мл препарата и образование ионами кобальта (II) с нитрозо-Р-солью окрашенного комплекса в кислой среде с последующим определением оптической плотности. К 500 мл препарата прибавляют раствор кислоты азотной концентрированной до pH 1,5-2, по частям сжигают полученный раствор в кварцевом (фарфоровом) тигле вместимостью 150-200 мл на электронагревателе, затем в муфельной печи при температуре 400 °С, которую повышают затем до 625 ± 25 °С. Сжигание продолжают до полной минерализации пробы. Содержимое тигля растворяют в концентрированной азотной кислоте. В профильтрованный и упаренный раствор добавляют натрия фторид для маскирования железа и проводят реакцию с раствором нитрозо-Р-соли. После последующей обработки натрием уксуснокислым, азотной кислотой и доведения объема ацетатным буфером раствор перемешивают и центрифугируют. Параллельно проводят определение кобальта в растворе рабочего стандартного образца (РСО) кобальта, сжигая в тигле 10 мл раствора РСО кобальта, и контрольный опыт, сжигая в тигле 10 мл воды. Измеряют оптическую плотность полученных надосадочных жидкостей на спектрофотометре при

длине волны 530 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения надосадочную жидкость, полученную в контрольном опыте.

Содержание кобальта в 1 мл препарата (X_{Co}), в граммах, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_1 \cdot m_0 \cdot 58,94}{D_0 \cdot 50 \cdot 10^5 \cdot 237,95}$$

где: D_1 - оптическая плотность надосадочной жидкости из испытуемого раствора;
 D_0 - оптическая плотность надосадочной жидкости из раствора РСО кобальта;
 m_0 - масса навески РСО кобальта, в граммах;
 $50 \cdot 10^5$ - коэффициенты пересчета содержания кобальта в 1 мл препарата;
 58,94 - атомная масса кобальта;
 237,95 - молекулярная масса кобальта хлористого 6-водного.

Допускается определение содержания кобальта в препарате методом атомно-абсорбционной спектрометрии [4]. Содержание кобальта комплексносвязанного в 1 мл препарата должно быть от $0,1 \cdot 10^{-8}$ до $0,2 \cdot 10^{-8}$ г.

Свободные ионы железа. Для проведения контроля рондферрина на наличие свободных ионов железа к 2 мл препарата прибавляют 6-кратный избыток спирта 95% для полного осаждения декстрана и комплексносвязанного железа. Дальнейший анализ проводят с надосадочной жидкостью, используя реакцию с сульфосалициловой кислотой. Затем проводят сравнение испытуемого раствора с эталоном, состоящим из эталонного раствора железа В, спирта этилового ректифицированного и такого же количества реактивов, какое прибавлено к испытуемому раствору. Окраска, появившаяся в испытуемом растворе, не должна превышать эталон (не более 0,0003%). Чувствительность реакции составляет $1 \cdot 10^{-4}$ %. Установлено, что в рондферрине непосредственно после производства и в течение всего срока хранения не выявлено наличия свободных ионов железа, что свидетельствует о высокой стабильности комплекса.

Молекулярно-массовые характеристики рондферрина в значительной степени определяют терапевтическую активность препарата. Молекулярная масса радиационно-модифицированного декстрана составляет 60000 Да. Молекулярную массу \bar{M}_w рассчитывают из уравнения Марка-Куна-Хаувинка: $[\eta] = K \cdot \bar{M}_w^\alpha$, где $[\eta]$ – характеристическая вязкость. Константы $K = 4,44 \cdot 10^{-4}$ и $\alpha = 0,54$ были определены из значений молекулярных масс, измеренных абсолютным методом светорассеяния на фотогониометре ФПС-3 и характеристических вязкостей $[\eta]$ для образцов радиационно-модифицированного декстрана [10].

В соответствии с требованиями ФС РБ 4200-2000 коэффициент полидисперсности \bar{M}_w / \bar{M}_n , определяющий ширину молекулярно-массового распределения, не превышает 2,0 (для полиглюкина – 2,4 и выше). Это свидетельствует о том, что способ радиационной деструкции, являющийся важным аспектом данной технологии, позволяет получать декстран с заданной молекулярной массой (60000 Да) и узким молекулярно-массовым распределением полисахарида. Технология обеспечивает получение клинической фракции препарата без дополнительных процедур фракционирования [6].

Методика определения остаточного спирта. Контроль за содержанием остаточного этилового спирта в растворе нативного декстрана и в конечном продукте осуществляется методом ГЖХ, разработанным в данном исследовании. Образцы препарата без дополнительной пробоподготовки и раствор РСО спирта этилового попеременно хроматографируют на газовом хроматографе Хром 41 с пламенно-ионизационным детектором, получая не менее 3 хроматограмм для каждого из растворов в следующих условиях: колонка размером 2000 x 3 мм, заполненная сорбентом хроматон NAW HMDS с 15% карбовакса 20М, размер частиц 0,16 - 0,20 меш (Chemapol); газ-носитель: азот; скорость газа-носителя - 30 мл/мин; температура колонки - 80°C; температура испарителя - 150°C; температура детектора - 150°C. Среднее значение площадей пиков спирта, вычисленное из хроматограмм препарата, не должно превышать среднего значения площадей

пиков спирта, вычисленного из хроматограмм раствора РСО спирта этилового (не более 0,1%). Результаты анализа считаются достоверными, если выполняются требования теста “Проверка пригодности хроматографической системы”. Относительная ошибка определения при определении спирта методом ГЖХ - 10,2%. Ранее использовавшийся метод определения спирта в декстрановых кровезаменителях [3] требовал длительного времени анализа (более 4 часов) и не обеспечивал необходимой точности и воспроизводимости, которые достигаются методом ГЖХ.

Используя методы контроля, представленные в работе и включенные в ФС РБ 4200-2000 на препарат рондферрин, был проведен анализ качества 20 промышленных серий кровезаменителя, произведенного в соответствии с промышленным регламентом ПР 76-97 (табл. 1). Низкая дисперсия даже наиболее лабильных нормируемых показателей (рН, относительная и характеристическая вязкости, молекулярная масса, цветность, отсутствие свободных ионов железа) свидетельствуют об устойчивости технологического процесса, воспроизводимости нормируемых показателей и высоком качестве препарата.

Исследования стабильности 25 серий экспериментальных и промышленных серий рондферрина выпуска разных лет подтверждают соответствие показателей качества нормативным требованиям на протяжении не менее 2 лет с момента выпуска препарата (табл. 2).

Особое внимание в работе было уделено изучению влияния материалов пробок, используемых для укупорки флаконов с препаратом, на стабильность металлодекстрановых комплексов. При изучении стабильности рондферрина по стандартной методике и методом ускоренного старения при температуре 40 °С было выявлено, что при использовании пробок из резины марки 52-369/1 по ТУ 38.006269-95, наиболее широко используемых в производстве инфузионных растворов, происходит образование черного хлопьевидного осадка и последующее разрушение металлодекстранового комплекса. Химический анализ осадка выявил, что он содержит нерастворимое соединение - CuS . Методом пи-

ролитической масс-спектрометрии, как наиболее чувствительной, исследован процесс газовой выделения из материалов образцов пробок, используемых для укупоривания инфузионных препаратов. В работе изучено газовойделение образцов пробок производства РФ и зарубежных пробок (производства Бельгии, Болгарии, Германии, Франции, Японии). Используемая методика позволила фиксировать все выделяющиеся продукты при постепенном нагреве образцов. Температура реактора с образцами изменялась по линейному закону со скоростью 10 град/мин. Верхний предел температур определялся началом интенсивной термодеструкции материала. Масс-спектры продуктов газовой выделения, снятые при разных температурах, свидетельствуют, что молекулярный состав летучих соединений довольно сложный и изменяется с температурой. В образцах пробки 52-369/1 масс-спектры продуктов можно разделить на два участка. Первый – до массового числа ионов 207, где нет четкой зависимости массовых чисел в интенсивных ионах. Второй участок – область более высоких массовых чисел ионов с характерно повторяющимися интенсивными ионами, массовые числа которых могут быть представлены выражением $207+74n$, где $n = 1, 2, 3, 4$, то есть характерные ионы с m/z 281, 355, 429, 503.

Этот второй участок масс-спектра отражает наличие олигомерных продуктов, в которых звено с массовым числом 74 последовательно присоединяется к матрице с массовым числом 207.

Что касается первого участка масс-спектров, то здесь следует отметить наличие довольно интенсивных пиков, которые могут быть отнесены к ионам, характерным для серы и серосодержащих соединений, таких как H_2S , SO_2 , CS_2 и, возможно, C_6H_8S , то есть ионы с m/z 43, 64, 76, 97. Все виды пробок перед анализом проходили соответствующую технологическую обработку, предусмотренную регламентом. По нашему мнению, причиной нестабильности рондферрина при использовании для укупорки пробок из резины марки 52-369/1 является газовойделение серосодержащих соединений [8], взаимодействующих с микроэлементами препарата, особенно, при повышенных температурах, например, при термической стерилиза-

ции. Анализ материала пробки 52-599/3 показал, что для масс-спектров продуктов газовой выделения заметно снижается интенсивность ионов m/z 32, 34, 64, 76, которые, по нашему мнению, свидетельствуют о более низком содержании соединений серы в материалах пробки, либо о более полной степени вулканизации. Поэтому нами в технологический регламент ПР.76-97 и ФС РБ 0042-2000 на препарат в разделе «Укупорка» включены пробки из резины марки 52599/3 по ТУ 58.106618-95. Такой вид укупорки обеспечивает стабильность показателей качества рондферрина.

ВЫВОДЫ

1. Проведено обоснование состава лекарственной формы препарата рондферрин и его физико-химических свойств, позволяющих получать препарат с гемодинамическим, реологическим и гемостимулирующим действием.
2. Научно обоснованы стадии технологического процесса производства рондферрина.
3. Показано, что радиационно-химический процесс деструкции и модификации декстрана позволяет получать препарат с заданными молекулярно-массовыми, гидродинамическими свойствами и стабильными металлодекстрановыми комплексами.
4. Для анализа физико-химических показателей препарата разработан ряд оригинальных методов, включенных в ВФС 42Б-42-97 и ФС РБ 0042-2000.
5. Анализ нормируемых показателей качества промышленных серий рондферрина свидетельствует о высокой устойчивости и воспроизводимости технологического процесса.
6. Проведенные исследования стабильности опытных и промышленных серий рондферрина показали стабильность препарата и соответствие всех показателей требованиям ФС РБ 0042-2000 в течение 2 лет.
7. В работе изучено влияние материала пробок, используемых для укупорки кровезаменителей, на стабильность препарата. Рекомендован наиболее подходящий тип пробки из резины марки 52599/3 по ТУ 58.106618-95.

8. Материалы работы использованы для разработки Опытного-промышленного регламента ОПР № 170 от 29.12.1994 и Промышленного регламента ПР.76-97.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.И., Городецкий В.М., Шулуто Е.М., Васильев С.А. Острая массивная кровопотеря. М., "Гэотар-Мед". 2001. 177 с.
2. Гапанович В.Н., Петров П.Т., Кондратенко Г.Г. и др. Влияние изоволемических инфузий кровезаменителя рондферрин на восстановление объемных показателей крови и интенсивность тканевого кровотока при острой массивной кровопотере. //Здравоохранение. – 2000. - № 7. – С. 22-25.
3. Государственная Фармакопея СССР. Х издание. М., "Медицина", 1968, с. 551-554.
4. Государственная Фармакопея СССР. XI издание. Вып. 1, 2. М., "Медицина", 1989.
5. Евдокименко В.М., Лапковский М.П., Марцуль А.В., Петров П.Т., Маркевич С.В. Влияние радиолитиза на структуру и свойства макромолекул некоторых полисахаридов. //Весці АН БССР, сер.хім.наук. – 1980. - № 1. – С. 14-17.
6. Петров П.Т., Евдокименко В.М., Маркевич С.В. Исследование молекулярно-массового распределения радиолитизованного декстрана. //Докл. АН БССР. – 1979. – т.23, № 7. – С. 639-642.
7. Петров П.Т., Иванов Е.П., Гапанович В.Н., Царенков В.М., Лапковский М.П., Климович О.М. Кровезаменитель полифункционального действия рондферрин. //Актуальные проблемы улучшения качества кровезаменителей, консервантов крови, гормональных и органотерапевтических препаратов: Материалы IV Всесоюзн. Научно-техн. конференции. – М., 1991. – С. 76.
8. Петров П.Т., Гапанович В.Н., Царенков В.М., Гаврилов М.В., Ивко А.А., Лапковский М.П. Исследование газовойделения из материала образцов пробок для укупоривания инфузионных препаратов // Актуальные проблемы разработки и производства кровезаменителей и консервантов крови: Материалы междунар. конф., Минск, 28 ноября–1 декабря 1994 г. – Минск, 1994. – С. 43–45.
9. Петров П.Т., Гапанович В.Н., Царенков В.М., Заборонок В.У., Лапковский М.П.,

Тюрин В.И., Забелло Т.Н. Пат. 2039754 РФ Способ получения низкомолекулярного декстрана. 20.08.95.

10. Петров П.Т., Штыкова Э.В. Гидродинамические и конформационные свойства облученного декстрана. //Докл. АН БССР. – 1998. – т. 32, № 7. – С. 631-634.
11. Петров П.Т., Гапанович В.Н., Царенков В.М., Лапковский М.П., Забелло Т.Н., Иванов Е.П., Климович О.М., Климович В.А. Способ получения металлодекстранового комплекса. Патент РБ № 3857. 13.11.2000 г.
12. Царенков В.М., Петров П.Т., Гаврилов М.В. и др. Заявка На 19990758 на патент "Штамм бактериальной культуры *Leuconostoc mesenteroides* БМП-98 для производства декстрана", 1999.07.29.
13. Царенков В.М., Петров П.Т. Новые биотехнологии в фармацевтическом производстве. //Известия Белорусской Инженерной академии. – 1996. - № 1. – С. 43-47.
14. Petrov P.T., Gapanovich V.N., Lapkovski M.P. IRS study of transformations in polysaccharides induced by γ -irradiation. //Fifth International Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules. Athens, Greece. Kluwer Academic Publishers, 1993, P. 275-276.
15. Zhabankov R.G., Firsov S.P., Korolik E.V., Petrov P.T., Lapkovski M.P., Tsarenkov V.M., Marchewka M.K., Ratajczak H. Vibrational spectra and the structure of medicinal biopolymers. //Journal of Molecular Structure. – 2000. – V. 555. – P. 85-96.

SUMMARY

P.T.Petrov

BLOODSUBSTITUENT WITH ANTIANEMIC ACTION RONDIFERRIN: MANUFACTURING METHOD, PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES, INVESTIGATION METHODS, STABILITY

Article contains major technological stages of manufacturing process of rondiferrin – bloodsubstituent with antianemic action, based on the metallodextran complexes (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}). Developed original quality control methods for the medicine, described physicochemical properties. Rondiferrin stability analysis conducted on large scale medicine series have shown that all quality control parameters comply for at least two years with prescribed in pharmaceutical article PA RB 4200-2000. Rondiferrin composition and peculiarities of physicochemical properties established wide functionality of it's properties – haemodynamic, reologic, antianemic.

**Таблица 1. Показатели качества рондферрина (посерийный контроль
промышленных серий препарата за 1997-2002 гг.)***

Показатель	Требования ФС РБ 0042-2000	Аналитические показатели при выпуске
Описание	Прозрачная жидкость красно-коричневого цвета	Соответствует
Подлинность	Характерные реакции на декстран модифицированный, натрий- и хлорид-ионы, железо окисное, медь	Соответствует
Прозрачность	Должен быть прозрачным	Прозрачен
Цветность	Окраска препарата, разбавленного в 2 раза водой, не должна превышать эталона № 1 а	Менее эталона
Механические включения	Должен выдерживать требования Инструкции по контролю на механические включения инъекционных лек. средств, утв. Приказом № 299 МЗ РБ от 23.09.99	Выдерживает
РН	4,5 - 7,0	$5,6 \pm 0,3$
<i>Посторонние примеси.</i> - азот - водорода перекись - Свободные ионы железа - Спирт - тяжелые металлы	Не более 0,001 %	Соответствует
	Должен выдерживать испытания на наличие перекиси водорода	Соответствует
	Не более 0,0003%	Соответствует
	Не более 0,1%	Соответствует
	Не более 0,0001 %	Соответствует
Относительная вязкость	1,7 - 2,9	$2,6 \pm 0,1$
Характеристическая вязкость, дл/г	0,154 - 0,184	$0,172 \pm 0,007$
Молекулярная масса, Да	50000 – 70000	62256 ± 4549
Молекулярно-массо-вое распределение (полидисперсность)	Значение коэффициента полидисперсности не должно превышать 2,00	$1,83 \pm 0,10$
Номинальный объем	Должен соответствовать требованиям ГФ XI	Соответствует
Стерильность	Должен быть стерильным	Стерилен
Пирогенность	Должен быть апиrogenным	Апирогенен
Токсичность	Должен быть нетоксичным	Нетоксичен
Реактогенность	Должен быть не реактогенным	Не реактогенен

<i>Количественное определение</i>		
Декстран модифицированный, $\cdot 10^{-3}$ г/мл	55,0 – 65,0	58,6 \pm 1,7
Железо	0,15 – 0,20	0,18 \pm 0,08
комплексносвязанное, $\cdot 10^{-3}$ г/мл	1,0 – 1,5	1,2 \pm 0, 1
Медь	10,0-20,0	15,0 \pm 1,1
комплексносвязанная, $\cdot 10^{-6}$ г/мл	8,5 – 10,0	9,1 \pm 0,3
Кобальт		
комплексносвязанный, $\cdot 10^{-9}$ г/мл		
Натрия хлорид, $\cdot 10^{-3}$ г/мл		

* проанализированы серии рондферрина 010697, 020697, 031297, 020998, 030998, 040998, 050998, 010499, 020499, 030499, 040499, 050499, 010701, 020701, 030701, 040701, 050701, 041202, 051202, 061202.

Таблица 2. Показатели качества препарата рондферрин в различные сроки хранения в естественных условиях

Показатель (по ФС РБ 0042-2000)	Требования ФС РБ 0042-2000	При выпуске препарата рондферрин**	Через 1 год хранения***	Через 2 года хранения*****
РН	4,5 - 7,0	$5,8 \pm 0,4$	$6,1 \pm 0,4$	$6,2 \pm 0,6$
Относительная вязкость	1,7-2,9	$2,6 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,2$	$2,6 \pm 0,1$
Характеристическая вязкость, г/дл	0,154-0,184	$0,172 \pm 0,007$	$0,168 \pm 0,009$	$0,172 \pm 0,006$
Молекулярная масса, Да	50000-70000	62007 ± 4753	59363 ± 4481	62007 ± 4074
Молекулярно-массовое распределение (полидисперсность)	Не должно превышать 2,00	$1,83 \pm 0,10$	$1,97 \pm 0,01$	$1,95 \pm 0,01$
Содержание декстрана модифицированного, $\cdot 10^{-3}$ г/мл	55,0-65,0	$58,1 \pm 1,8$	$57,8 \pm 1,5$	$57,0 \pm 0,8$
Содержание железа комплексносвязанного, $\cdot 10^{-3}$ г/мл	0,15 - 0,20	$0,17 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,01$
Содержание меди комплексносвязанной, $\cdot 10^{-6}$ г/мл	1,0 – 1,5	$1,3 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,1$
Содержание кобальта комплексносвязанного, $\cdot 10^{-9}$ г/мл	10,0-20,0	$13,0 \pm 0,2$	$13,0 \pm 0,1$	$14,0 \pm 0,1$
Содержание натрия хлорида, $\cdot 10^{-3}$ г/мл	8,5 – 10,0	$9,1 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,4$
Другие измеренные показатели*	Должны соответствовать требованиям ФС РБ 0042-2000	Соответствуют требованиям ФС РБ 0042-2000	Соответствуют требованиям ФС РБ 0042-2000	Соответствуют требованиям ФС РБ 0042-2000

* согласно разделам ФС РБ 0042-2000: Описание, Подлинность, Прозрачность, Цветность, Механические включения, Посторонние примеси, Номинальный объем, Стерильность, Пирогенность, Токсичность, Реактогенность.

** - серии препарата Рондферрин 010394, 020394, 030394, 040394, 050394, 010697, 020697, 031297, 020998, 030998, 040998, 050998, 010499, 020499, 030499, 040499, 050499, 010701, 020701, 030701, 040701, 050701, 041202, 051202, 061202;

*** - серии препарата Рондферрин 010394, 020394, 030394, 040394, 050394, 031297, 020998, 030998, 040998, 050998, 010499, 020499, 030499, 040499, 050499, 010701, 020701, 030701, 040701, 050701;

****- серии препарата Рондферрин 010394, 020394, 030394, 040394, 050394, 031297, 020998, 030998, 040998, 050998, 010499, 020499, 030499, 040499, 050499